

## 醱酵飼料의 生産에 關한 研究(第 2 報)

—有用酵母菌의 酵素生成條件과 硫酸添加의 影響—

裴 貞 高 · \*朴 允 仲 · \*李 錫 健 · \*\*李 澤 守

(大田農業高等專門學校 \*忠南大學校農科大學 \*\*삼포醬油釀造場)

## Studies on the Production of Fermented Feed(2)

### The Conditions of Enzyme Production and Influence of Addition of Ammonium sulfate in the culture of Useful Yeasts

BAE, Jung Surl. \*Yoon Joong PARK. \*Suk Kun LEE. \*\*Taik Soo LEE

(Taejon Agricultural Junior College \*College of Agriculture, Chung Nam University.)

\*\*Saimpyo Soysauce Brewery.

#### ABSTRACT

In solid culture of *Endomycopsis fibuliger* No. 55, *Endomycopsis javanensis* No. 112 and *Candida tropicalis* No. 340, the conditions of enzyme (protease, amylase and cellulase) production and the influence of addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  were examined, and the results obtained were as follows.

(1) Wheat bran medium is found to be the best on the enzyme production in case of simple material. The optimum conditions; are water content added 100 to 120%, temperature 25 to 30°C and incubation times 2 to 3 days.

(2) The cellulase production was scarcely produced in the case of *Endomycopsis fibuliger* No. 55, as well as, the amylase production was scarcely produced in the case of *Endomycopsis javanensis* No. 112 and *Candida tropicalis* No. 340.

(3) The enzyme production was remarkably increased when 5% of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as inorganic nitrogen sources was admixed to wheat bran.

(4) When 5% of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was admixed to medium, the ratio of protein increase was 10.2 to 17.7% in wheat bran medium and 10.6 to 17.9% in sweet potato cake medium.

#### 緒 論

醱酵飼料에는 微生物의 菌體成分을 直接飼料로 利用하는 경우와 微生物의 酵素를 利用하여 飼料成分의 消化吸收를 돕는 두가지 경우를 들수 있다. 飼料用의 微生物 酵素에 關한 研究로서는 *Trichoderma viride*의 cellulase에 關한 成(1969), 鄭(1969), 外山(1962), 등의 報告와 *Aspergillus* 屬菌의 cellulase에 關한 金等(1969)의 報告가 있으며 現今先

進國에서는 飼料用의 微生物 cellulase를 工業的으로 生産하기에 이르고 있다. 그러나 酵母 및 不完全菌의 酵素利用에 關한 研究로서는 駒形等(1966)의 酵母菌에 依한 protease 生産에 關한 特許, 成(1969), 鄭(1969), 外山(1962) 등의 *Trichoderma viride*에 依한 cellulase, 服部(1960)의 *Endomycopsis* 類似菌에 依한 糖化酵素等 그 數가 極히 적으며 特히 *Trichoderma*의 cellulase를 除外하고는 酵母菌의 酵素를 飼料에 利用하기 위한 研究는 아직 尠

아볼 수 없다. 著者(裴等 1971) 등은 酵母菌의 菌體와 酵素 利用面을 綜合的으로 檢討하기 爲하여 前報에서 菌體增殖率이 높은 酵母菌 3株를 分離同定하고 菌體增殖를 爲한 培養條件에 對하여 報告한 바 있다. 이어서 이들 菌體의 밀기울 固體培養에 있어서의 酵素生成 條件과 無機窒素源의 影響에 對하여 實驗하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 1. 供試菌株

前報에서 分離同定한 *Endonycopsis fibuliger* No. 55, *Endomycopsis javanensis* No. 112, *Candida tropicalis* No. 340, 등을 供試菌株로 하였다.

#### 2. 培養方法

培地の 原料 및 添水量을 달리한 實驗外에는 밀기울에 120% 添水한 것을 250ml 容 三角 flask 에 20g 식 넣어 加壓殺菌後供試菌株를 接種하고 培養溫度 培養日數等에 對한 實驗外에는 30°C 에서 3日間 培養하였다.

#### 3. Protease 測定

##### (1) 酵素液

固體培養物을 風乾한 다음 乾 koji 에 對하여 1% 食鹽水 5 倍量을 加하고 室溫에서 2 時間 浸出한 濾液을 酵素 5 倍 稀釋液으로 使用하였다.

##### (2) 基質의 調製

milk casein 3g 을 N/10 NaOH 20ml 로서 加熱溶解한 다음 冷却 시키고 N/10 Hcl 과 N/10 NaOH 를 써서 pH 6.0 으로 조정하고 다시 pH 6.0 의 McIvain buffer 20ml 를 가하고 純水로서 全量을 100ml 가 되게 하였다.

##### (3) C. F. U. 單位

酵素作用에 依하여 3% casein 液으로 부터 生成한 遊離 amino 酸을 越田等(1967) 등의 Formal 滴定法에 따라 測定하고 C. F. U. (casein formal unit)로 表示하였다.

##### (4) 測定操作

口徑 約 18mm 의 試驗管에 基質 10ml 식 을 取하여 45°C 의 恒溫水槽에서 10 分間 豫

熱한 後酵素液 5ml 를 加하고 3 時間 反應시킨 다음 沸騰湯浴中에서 5 分間 담가 酵素活性을 停止시키고 다시 冷却하여 100ml 容 三角 flask 에 옮겨서 formal 法에 依하여 N/20 NaOH 로 滴定하였다. 同一하게 基質만을 45°C 에 3 時間 놓아 둔것과 酵素液 5ml 에 對하여 滴定한 對照值와의 差를 Xml 라고 하면 Koji 1g 當의 力價는 C.F.U. 로서 다음 式과 같다.

$$C.F.U. = \frac{x \times 20 \times F}{1 - \frac{m}{100}}$$

F: N/20 NaOH 의 factor

m: Koji 의 水分

#### 4. Amylase 測定

##### (1) 酵素液

乾 Koji 에 對하여 1% 食鹽水 10 倍量을 加하고 室溫에서 2 時間 浸出한 濾液을 酵素 10 倍 稀釋液으로 하였다.

##### (2) 基質의 調製

可溶性 澱粉을 無水物로서 1.2g 取하여 물에 녹인 다음 pH 5.0 의 Walpole buffer 20 ml 를 넣고 물을 加하여 100ml 로 하였다.

##### (3) A.U. 單位

1% 可溶性 澱粉液을 pH 5.0, 溫度 40°C 에서 作用 시킬때 乾 Koji 1g (液體 Koji 의 경우는 1ml)에 依하여 10 分間에 1mg 의 glucose 에 相當하는 還元力을 生成하는 活性을 I.A.U. 로 하였다.

##### (4) 測定操作

1.2% 可溶性 澱粉 12.5ml 를 口徑 18mm 의 test tube 에 取하고 40°C 의 恒溫水槽中에서 數分間 豫熱한後 適宜稀釋한 酵素液 2.5ml 를 加하여 잘混合한다. 混合直後 25ml 을 sampling 하고 20 分 後에 다시 5ml 을 sampling 한 것을 各各 hypoiodide 法(朴, 李 1968)으로 糖定量을 하여 酵素反應에 依한 glucose 生成量으로 부터 다음과 같이 A. U. 값을 求하였다.

$$A. U. = \frac{\text{生成 glucose 量} \times 3}{\text{酵素液量 (2.5ml)} \times 2}$$

× 酵素稀釋倍數

5. Cellulase 測定

(1) 酵素液

amylase 測定時의 酵素液과 同一한 方法으로 浸出하여 使用하였다.

(2) 基質의 調製

C.M.C. (carboxy methyl cellulose) 1g 을 50ml 의 물에 均一하게 녹이고, PH 4.5 의 Walpole buffer 20ml 를 加하여 100ml 로 하였다.

(3) 粘度低下力

C.M.C 의 粘度低下力으로서 表示하였다. 即 PH 4.5 의 1% C.M.C. 溶液을 溫度 40°C, 15 分間 作用시킬때 酵素液 1ml 에 依한 相對 粘度의 低下度를 Ostwald 粘度計로 求하였다.

(4) 測定操作

1% C.M.C 溶液 9ml 를 넣은 徑 18mm 의 試驗管을 40°C 의 水浴中에서 5 分間 豫熱한 後 酵素液 1ml 를 넣어 15 分間 作用시킨 다음 沸騰湯浴中에서 3 分間 담그고 20°C 로 冷却되었을때 7ml 를 取하여 Ostwald 粘度計에 注入하고 20°C 로 保存하면서 5ml 의 流下速度를 測定하였다(V<sub>0</sub>). 한편 沸騰湯浴中에서 3 分間 담겨 不活性化한 酵素液을 基質

에 加하여 같은 方法으로 測定하고 (V<sub>0</sub>) 또 한 蒸溜水에 酵素液을 加한 것의 流下速度를 測定하여 (V<sub>s</sub>) 다음과 같이 粘度低下度를 百分率(A)로 表示하였다.

$$A = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_s} \times 100$$

6. 純蛋白質의 定量

Barnstein 法 (1900)에 依하여 定量하였다. 即 試料 1~2g 을 beaker 에 取하고 물100ml 를 加하여 沸騰할때까지 加熱한 다음 硫酸銅液(60g/l) 25ml 를 加하여 잘 攪拌하고 NaOH 液(12.5g/l) 25ml 를 加한 다음 生成되는 蛋白質 沈澱物을 洗滌乾燥하고 micro-kjeldahl 法에 依하여 定量하였다.

結果 및 考察

1. 酵素生成의 培養條件

(1) 培養原料

各種 農業加工 副産物을 培地原料로 하여 120% 添水한 培地에 供試菌株을 接種하고 30°C 로 3 日間 培養한 다음 風乾한 Koji 의 protease, amylase, cellulase 等を 測定한 結果는 Table 1. 과 같다.

Table 1. The effects of raw materials of medium on the enzyme production by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Kinds of medium	Strains			No. 55			No. 112			No. 340		
	Enzyme activities	P	A	C	P	A	C	P	A	C		
Wheat bran		22	26.5	—	16	—	80	14	—	77		
Defated perilla		18	15.4	—	12	—	62	—	—	43		
Rice bran		—	8.1	—	—	—	52	12	—	48		
Defated sesame		16	15.4	—	14	—	57	16	—	62		

P; protease, A; amylase, C; cellulase  
Activity unit Protease; C.F.U. Amylase: A. U  
Cellulase; depression ratio of viscosity(%)

어느 경우나 밀기울이 가장 良好 하였으며, 들깨粕, 참깨粕, 쌀겨等の 順으로 菌의 生育이나 酵素生成이 良好하였다. 其他 보리겨, 고구마 澱粉粕, 油菜粕等에서는 菌의 生育이

極히 不良하였으며 酵素의 生成도 不良하였다. 이 結果는 朴(1970)이 *Bac. subtilis* 의 菌體培養에 있어서 amylase 生産의 單一原料로서 밀기울이 가장 良好하며 油菜粕이 가장

**Table 2.** Influence of amount of water added to medium of wheat bran on the enzymes production by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Enzyme activities Amount of water(%)	Strains No. 55			No. 112			No. 340		
	P	A	C	P	A	C	P	A	C
80	16	18.9	—	10	—	78	8	—	61
100	20	26.5	—	17	—	86	12	—	75
120	22	27.0	—	16	—	89	12	—	78
140	18	26.1	—	12	—	80	10	—	78

P; protease, A; amylase, C; cellulase,  
Activity unit

Protease; C.F.U. Amylase; A.U. Cellulase; depression ratio of viscosity (%)

不良하다고한 報告와 傾向이 같다. 한편 밀기울에 고구마澱粉粕, 油菜粕을 30~70% 混合하여 使用한 境遇에도 菌의 生育이나 酵素生成이 不良하였는데 이點으로 보아 고구마澱粉粕이나 油菜粕은 混合原料로서 不適當함을 알 수 있었다. 本實驗에 使用한 3 菌株의 酵素力을 보면 *Aspergillus* 屬菌에 比하여 그 力價가 매우 낮았으며 strain No. 55는 cellulase를 거의 生成하지 않고 strain No. 112 및 strain No. 340은 amylase를 生産하지 않는 點이 特徵이라고 하겠다 *Endomycopsis fibuliger*에는 液化 amylase를 相當히 生産하는 菌株가 있다고 알려져 있으며 服部(1960)는 *Endomycopsis* 類似菌을 써서 糖化 amylase를 工業의으로 生産하는 特許를 얻은바 있는데 單一原料의 固體培地에 培養하

는 境遇 strain No. 55는 amylase 生産 菌株로서는 成績이 좋지 않음을 알 수 있다.

(2) 添水量의 影響

밀기울을 培地原料로하고 添水量을 밀기울에 對하여 80~140%로 各各 달리한 培地에 供試菌株를 培養하여 酵素力을 測定한 結果는 Table 2와 같다.

供試菌株 모두가 添水量 100~120%에서 酵素生成이 良好하였으며 80% 또는 140%添水時는 酵素生成이 不良 하였다.

(3) 培養溫度

밀기울培地에 供試菌株를 接種하여 25~40°C로 溫度를 달리하여 培養했을때 酵素生成에 미치는 培養溫度의 影響은 Table 3과 같다. strain No. 55의 培養最適溫度는 25~30°C였으며 strain No. 112와 strain No. 340

**Table 3.** Influence of cultural temperature on the enzymes production by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Enzyme activities Temp. (°C)	Strains No. 55			No. 112			No. 340		
	P	A	C	P	A	C	P	A	C
25	20	25.0	—	12	—	80	8	—	71
30	20	26.5	—	16	—	88	12	—	77
35	16	13.5	—	8	—	75	6	—	53
40	6	5.0	—	4	—	51	2	—	42

P; protease, A; amylase, C; cellulase  
Activity unit

Protease; C.F.U. Amylase; A.U. Cellulase; depression ratio of viscosity(%).

**Table 4.** Influence of cultural days on the enzyme production by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Days	Enzyme activities	No. 55			No. 112			No. 340		
		P	A	C	P	A	C	P	A	C
2		24	24.3	—	12	—	80	6	—	70
3		22	26.3	—	16	—	89	14	—	78
4		18	18.9	—	14	—	90	12	—	73

P; protease, A; amylase C; cellulase

Activity unit

Protease; C.F.U. Amylase; A.U Cellulase; depression ratio of viscosity(%)

은 30°C 에서 酵素生成이 良好하였다.

(4) 培養日數

밀기울培地에 供試菌株를 接種하고 30°C 에서 培養期間을 2~4 日間 各各 달리한 境遇의 酵素力價는 Table 4 와 같다.

strain No. 55 는 培養 2 日後 酵素力이 가장 높았으며 strain No. 112 와 strain No.340 은 3 日後에 最高의 力價를 나타냈다. 培養日數가 4 日以上 經過 할 때에는 酵素力價는 減少되었다.

2. 硫酸添加의 影響

(1) 酵素生成

밀기울에 對하여 硫酸 0.5~7.5%와 硫酸量의 70%에 該當하는 CaCO<sub>3</sub> 를 添加한 培地를 만들어 供試菌을 培養할때 酵素生成에 미치는 影響을 살핀 結果는 Table 5 와 같다

밀기울에 硫酸을 添加 했을때 供試菌株 어느 것이나 酵素生成을 增加시켰다. 特히 硫酸을 밀기울에 對하여 5% 以上 添加 했을때 strain No. 55 의 amylase 生成이 control 에 比하여 2 倍 以上으로 增加 되었으며 strain No. 112 와 strain No. 340 의 protease 生成은 4 倍 以上으로 增加되었다. 前報(裴等 1971)한 바와 같이 이들 供試菌의 液體培養에 依한 菌體生産에 있어서 硫酸의 利用率은 極히 적었으며 0.5%以上 添加 했을때는 오히려 生育이 阻害되었으나 밀기울 固體培養에 있어서는 5% 添加에서도 生育에 하등의 支障이 없었을뿐만 아니라 酵素生成이 顯著하게 增加되었다. 이와같은 事實은 液體培養의 境遇에 比하여 固體培養의 境遇에는 硫酸吸收時 遊離되는 酸基의 影響을 培地原料의 緩衝作用에 依하

**Table 5.** Effects of ammonium sulfate added on the enzyme production by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Amount added (%)	Enzyme activities	No. 55			No. 112			No. 340		
		P	A	C	P	A	C	P	A	C
0		20	263	—	16	—	85	12	—	75
0.5		26	30.3	—	20	—	86	16	—	77
1.0		28	32.4	—	26	—	88	16	—	80
2.5		32	35.1	—	50	—	90	33	—	85
5.0		36	59.4	—	74	—	96	64	—	92
7.5		35	60.2	—	72	—	95	54	—	90

P; protease, A; amylase, C; cellulase

Activity unit Protease; C.F.U. Amylase; A.U. Cellulase; depression ratio of viscosity (%).

**Table 6.** Effect of ammonium sulfate added on the protein synthesis by strain No. 55, No. 112 and No. 340.

Medium (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)	Strains		No. 55		No. 112		No. 340	
	W	S	W	S	W	S	W	S
0	17.34 (-)	3.90 (-)	14.72 (-)	4.70 (-)	15.58 (-)	3.46 (-)		
1.0	17.99 (3.74)	4.12 (5.64)	15.93 (8.25)	5.15 (9.45)	16.36 (5.01)	3.75 (8.38)		
2.5	18.46 (6.48)	4.30 (10.25)	16.45 (11.75)	5.46 (16.11)	16.73 (7.38)	3.82 (10.40)		
5.0	19.11 (10.20)	4.50 (15.40)	17.32 (17.66)	5.54 (17.87)	17.23 (10.59)	3.94 (13.89)		
7.5	18.87 (8.11)	4.53 (16.15)	17.14 (16.51)	5.51 (17.23)	17.10 (9.75)	3.90 (12.69)		

W; wheat bran S; starch cake of sweet potatoes  
C; ratio of increase of pure protein

여 더욱 效果的으로 抑制 하기 때문이라고 생각된다.

## (2) 純蛋白質의 合成

밀기울 및 고구마澱粉粕에 硫酸을 前記 方法에 準하여 1.0~7.5% 添加하여 培地를 만들고 風乾한 다음 Barnstein 法에 依하여 純蛋白質의 量과 純蛋白質의 增加率을 調査한 結果는 Table 6 과 같다.

밀기울이나 澱粉粕에 硫酸을 添加하여 培地로한 境遇 純蛋白質의 增加率은 顯著하였다. 5% 添加 했을때 純蛋白質의 增加率은 約 10~18%였으며 培地別로는 밀기울의 境遇보다 고구마澱粉粕의 境遇 純蛋白質 增加

率이 더욱 높았다. 住江(1949)는 고구마粉에 硫酸을 3%씩 2回添加하여 *Asp. oryzae* 로 製麴한 境遇 麴中の 純蛋白質量은 19.64% 로서 最大値에 達했다고 報告 하였으며 金等(1962)은 고구마 및 고구마澱粉粕에 4% 의 硫酸을 添加하여 麴菌을 培養하므로써 純蛋白質量 9~11%인 醱酵飼料를 製造할 수 있다고 報告한 바 있다. 絲狀菌의 蛋白質 合成에 對하여는 坂口(1950)等の 報告가 있으며 酵母에 依한 ammonia 態窒素利用 機作에 對하여는 菅原潔(1958)等の 報告를 볼 수 있다.

## 摘 要

前報에서 分離同定된 *Endomycopsis fibuliger* No. 55, *Endomycopsis javanensis* No. 112, *Candida tropicalis* No. 340 의 固體培養에 있어서 酵素(protease, amylase, cellulase) 生成條件과 硫酸의 添加影響에 對하여 實驗한 結果는 다음과 같다.

1) 酵素生成培地の 單一原料로는 밀기울이 가장 良好하였으며 添水量 100~120%, 培養溫度 25~30°C, 培養期間 2~3日이 最適條件이었다.

2) *Endomycopsis fibuliger* No. 55 는 cellulase 를 거의 生成하지 않았으며 *Endomycopsis javanensis* 와 *Candida tropicalis* No. 340 는 amylase 를 거의 生成하지 않았다.

- 3) 無機窒素源으로서 硫安을 밀기울에 대하여 5%添加 했을때 酵素生成이 顯著하게 增加되었다.
- 4) 硫安을 5% 添加하여 培養한 境遇, 밀기울培地에서는 蛋白質 增加率이 10.2~17.7%였으며 高구마 澱粉粕培地에서는 10.6~17.9%였다.

### 引 用 文 獻

1. 金浩植, 曹惠鉉, 姜禧信, (1962). 麴菌醱酵飼料의 製造法에 關한 研究, 서울大 論文集 生農系 11 69~71
2. 金燦祚, 崔宇永, (1969). cellulase 生産菌에 關한 研究(1), 有用菌의 分離 및 그 培養條件에 對하여, 韓國農化誌 11 83~88
3. 金燦祚, 崔宇永, (1969). cellulase 生産菌에 關한 研究(2), 分離菌株의 同定 및 그 利用에 對하여, 韓國農化誌 11 89~94
4. 外山 信男 (1962), cellulase 9 生産と 應用. 日本食品工業誌 5 (No. 16) 11~16
5. F. Barnstein: (1900) Landw. Vers. Stationen 54, 327
6. 朴允仲, 李錫健, (1968). Asp. 屬菌에 依한 耐酸性 Amylase 生産에 關한 研究 (1), 分離 및 培養 pH에 對하여, 韓國農化誌 9 91~96
7. 朴允仲, (1970). 細菌에 依한 Amylase 生産에 關한 研究, 韓國農化誌 13 153~170
8. 坂口謹一郎, 岡崎浩, 岩崎孝志 (1950). 糸狀菌による 蛋白質合成에 關する 研究, 日農化誌 24 77~79
9. 菅原潔, 熊谷和夫, 志村憲助, (1958). 酵母による ammonia 態窒素의 利用機作에 關する 研究 (1), 窒素飢餓酵母에 對하여 基礎的 諸條件의 檢討, 日農化誌 32 348~351
10. 菅原潔, 熊谷和夫, 志村憲助(1958). 酵母による Ammonia 態 窒素의 利用機作에 關する 研究 (2), 有機酸의 影響에 對하여, 日農化誌 32 352~355
11. 住江金之, 松家芳範, (1948). 微生物による 蛋白質食料, 飼料의 製造(2), 特に 甘藷麴을 利用せる 場合に 就て, 日農化誌 23 507~509
12. 駒形和男, 中瀬崇, 光木光司, 奥村信二(1966). 酵母による 蛋白質分解酵素의 製造法. 日本特許 41~10194
13. 越田考吉, 六川功一, 松山公雄, 望月 務 (1967). Fromal法による protease の測定法, 日本釀協誌 62 418
14. 成洛癸, (1969). 纖維素分解酵素에 關한 研究 (4) Trichoderma viride 가 生成하는 粗酵素의 性質에 對하여, 韓國農化誌 12 25~31
15. 成洛癸, (1969). 纖維素分解酵素에 關한 研究 (5) Trichoderma viride 가 生成하는 cellulolytic complex 의 分別에 對하여, 韓國農化誌, 12 99~105
16. 鄭東孝, (1969). cellulase 에 關한 研究 (1), cellulase 生成菌의 分離와 粗酵素의 諸性質, 韓國農化誌, 11 109~117
17. 鄭東孝, (1969). cellulase 에 關한 研究 (2), cellulase 生成菌 ku-3371, ku-4383, 의 菌學的 性質, 韓國農化誌, 11 119~122
18. 服部行彦(1960). エンドミコプシス類似特殊菌による 糖化アマラゼ의 製造法, 日本特許 昭和 35~15428